



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/12, C12N 7/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/04803 (43) Date de publication internationale: 13 février 1997 (13.02.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01195 (22) Date de dépôt international: 29 juillet 1996 (29.07.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/09374 1er août 1995 (01.08.95) FR 96/03638 22 mars 1996 (22.03.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69348 Lyon Cédex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FANGET, Bernard [FR/FR]; La Vavre, F-69210 Saint-Germain-sur-l'Arbresle (FR). FRANÇON, Alain [FR/FR]; La Grand Croix, Brulioles, F-69069 Bessenay (FR). HEIMENDINGER, Pierre [FR/FR]; Le Montségur, 35, rue Bataille, F-69008 Lyon (FR). (74) Mandataire: BERNASCONI, Jean; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR INDUSTRIALLY PRODUCING A JAPANESE ENCEPHALITIS VACCINE, AND RESULTING VACCINE (54) Titre: PROCEDE DE PRODUCTION INDUSTRIELLE D'UN VACCIN CONTRE L'ENCEPHALITE JAPONAISE ET VACCIN OBTENU (57) Abstract <p>A method is disclosed for industrially producing a Japanese encephalitis vaccine, wherein (a) cells from a cell line are cultured, (b) the resulting cell culture is inoculated with a Japanese encephalitis virus in the presence of a viral growth medium, (c) the virus is propagated and multiplied on the cells, (d) the viral growth medium is recovered in the form of a suspension of viruses produced by the cells, (e) the virus suspension is purified in at least one ion exchange chromatography step and a gel permeation step, and (f) the virus suspension is formulated and converted into a pharmaceutical form to preserve it until the moment of use. A Japanese encephalitis vaccine characterised in that it comprises a Japanese encephalitis virus produced by culturing cells from a cell line, and in that the cellular DNA content is less than 100 pg/dose, is also disclosed.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne un procédé de production industrielle d'un vaccin contre l'encéphalite japonaise, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes: a) mise en culture de cellules provenant d'une lignée cellulaire, b) inoculation de la culture de cellules obtenue par du virus de l'encéphalite japonaise en présence d'un milieu de multiplication virale, c) propagation et multiplication du virus sur les cellules, d) récolte du milieu de multiplication virale constituant une suspension de virus produits par les cellules, e) purification de la suspension virale par au moins une étape de chromatographie échangeuse d'ions et une étape de perméation de gel, f) formulation et mise sous forme pharmaceutique de la suspension virale pour assurer sa conservation jusqu'à son utilisation. L'invention concerne également un vaccin contre l'encéphalite japonaise caractérisé en ce qu'il comporte du virus de l'encéphalite japonaise obtenu par culture sur cellules provenant d'une lignée cellulaire, et en ce que la teneur en ADN cellulaire est inférieure à 100 pg/dose.</p>		

Procédé de production industrielle d'un vaccin
contre l'encéphalite japonaise et vaccin obtenu

La présente invention a trait à un procédé de production d'un vaccin pour la prévention de l'encéphalite japonaise, à base de virus de l'encéphalite japonaise (JEV) et notamment d'un vaccin utilisable chez l'homme. L'invention a également trait au vaccin obtenu par ce procédé.

Le virus de l'encéphalite japonaise, dont le vecteur de transmission est un moustique, est la cause d'infections graves, dites encéphalites japonaises, dans de nombreux pays d'Extrême-Orient ainsi que dans d'autres régions du monde.

On connaît des vaccins contre l'encéphalite japonaise qui sont obtenus par des procédés consistant à injecter le virus JEV par voie intracrânienne chez le souriceau et à récupérer les tissus infectés. L'émulsion tissulaire que l'on obtient est ensuite purifiée, généralement par des méthodes de précipitation, notamment à la protamine. D'autres techniques de purification de ces préparations tissulaires ont également été proposées dans la littérature, telles que des techniques d'ultrafiltration, de filtration et de centrifugation, ou de précipitation au polyéthylène glycol, ces techniques pouvant être combinées entre elles ou à des techniques de gel-filtration, de chromatographie sur sulfate de cellulose ou sur sulfate de polysaccharide réticulé (JP-B-65 000 611, JP-A-53 133 627, JP-A-50 048 118, JP-A-2 223 531, US-A-4 725 546, JP-A-49 020 322 et B-81 005 204, JP-B-67 025 408).

Dans l'art antérieur, les préparations virales sont inactivées, ainsi que le recommande l'Organisation Mondiale de la Santé, par des agents chimiques tels que le formol selon des procédures standardisées, à savoir inactivation de longue durée

tion sur lignées cellulaires.

L'invention se propose donc de remédier à ces inconvénients et de fournir un procédé de production d'un vaccin contre l'encéphalite japonaise, qui puisse être
5 mis en oeuvre à grande échelle dans des conditions sûres, rapides et économiques et qui permette d'obtenir un vaccin, efficace d'une très grande pureté, avec un très bon rendement industriel.

Pour atteindre ces buts, l'invention a pour
10 objet un procédé de production industrielle d'un vaccin contre l'encéphalite japonaise, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- a) mise en culture de cellules provenant d'une lignée cellulaire,
- 15 b) inoculation de la culture de cellules obtenues par du virus de l'encéphalite japonaise en présence d'un milieu de multiplication virale,
- c) propagation et multiplication du virus sur les cellules,
- 20 d) récolte du milieu de multiplication virale constituant une suspension de virus produits par les cellules,
- e) purification de la suspension virale par au moins une étape de chromatographie échangeuse d'ions et une étape de perméation de gel,
- 25 f) formulation et mise sous forme pharmaceutique de la suspension virale pour assurer sa conservation jusqu'à son utilisation.

Selon une caractéristique particulière de l'invention, la quantité de virus inoculée correspond à
30 une multiplicité d'infection inférieure à 0,1. Ainsi, on obtient un bon rendement pour la propagation et la multiplication virale.

Selon une caractéristique particulière de l'invention, le procédé comprend, en outre, une étape
35 d'inactivation de la suspension virale avant ou après

cellulaire est inférieure à 100 pg/dose.

Un tel vaccin présente à la fois l'efficacité et la sûreté nécessaire tant du point de vue des contaminants viraux que des protéines pour être administré de façon systématique à toute personne susceptible d'être en contact avec le virus.

D'autres objets et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre.

Selon l'invention, on peut effectuer la culture cellulaire, soit en fermenteur, soit de façon traditionnelle en flacons (boîtes de Roux, flacons roulants, Multiray™, Cell-Cube™...).

De préférence, cependant, on dispose d'un fermenteur de grand volume (500 à 2000 l) contenant des microporteurs ainsi qu'un milieu de culture cellulaire, dans lequel on introduit un inoculum de cellules d'une lignée cellulaire permissive au virus de l'encéphalite japonaise ; il peut s'agir de cellules BHK 21 (Baby Hamster Kidney) ou encore de cellules Vero.

Les microsupports permettant la culture en suspension dans le fermenteur peuvent être différents microsupports déjà connus pour un tel usage ; on peut notamment citer les particules Cytodex 1™ à une concentration de 1 à 3 g/l de milieu de culture comme convenant particulièrement bien à la culture de cellules Vero. Les durées, températures et autres conditions de culture, et notamment la composition du milieu de culture sont adaptées en fonction de la nature des cellules Vero sur microsupports de Cytodex 1™, une durée de 4 jours était appropriée pour obtenir une bonne croissance cellulaire et permettre ainsi d'inoculer le virus avant la phase stationnaire de la culture. On remplace ensuite le milieu de culture par un milieu de multiplication virale et on introduit dans le fermenteur un inoculum de virus de

jusqu'à 8 récoltes successives dans le même fermenteur à partir de la même culture cellulaire. La durée nécessaire à la propagation et à la multiplication du virus pour obtenir une dose LD 50/ml de 10^7 ou 10^8 est généralement de 2 à 3 jours ; on réalise de préférence une première récolte 3 jours après l'inoculation virale, puis des récoltes successives tous les 2 ou 3 jours.

Ainsi, un cycle complet dans un fermenteur, peut durer 23 jours répartis de la façon suivante :

- 10 . J0 : démarrage de la culture de cellules sur les microsupports dans le fermenteur,
- . J4 : remplacement du milieu de culture cellulaire par du milieu de multiplication virale et inoculation du virus,
- 15 . J7 : première récolte,
- . J9 : deuxième récolte,
- . J11 : troisième récolte,
- . J14 : quatrième récolte,
- . J16 : cinquième récolte,
- 20 . J18 : sixième récolte,
- . J21 : septième récolte,
- . J23 : huitième récolte.

Les différentes récoltes obtenues peuvent ensuite être traitée séparément ou en mélange.

25 Le traitement consiste soit en une purification et une inactivation, l'inactivation pouvant être réalisée avant ou après l'étape de purification.

L'inactivation est une étape indispensable au procédé selon l'invention lorsque la souche virale utilisée au départ est une souche virulente ; par contre, lorsque la souche utilisée pour la multiplication virale est une souche atténuée telle que la souche SA 14-14-2, cette étape d'inactivation peut être soit omise, soit réalisée afin d'être dans les meilleures conditions de sécurité possibles.

1000. La concentration peut être effectuée par les moyens habituels et notamment l'ultrafiltration.

La suspension virale, inactivée ou non selon le procédé utilisé, doit être purifiée. Selon une caractéristique importante de l'invention, l'étape de purification comprend au moins une chromatographie. De façon avantageuse, on procède successivement aux 3 étapes suivantes :

- . chromatographie échangeuse d'ions,
- . chromatographie d'adsorption,
- . perméation de gel.

La chromatographie échangeuse d'ions est de préférence une chromatographie échangeuse d'anions, qu'ils soient faibles ou forts. Le support utilisé est par exemple le DEAE-Sphero-dex™ (vendu par Biosepra, USA) qui retient sélectivement les particules virales et laisse passer l'essentiel des protéines contaminantes.

L'éluat contenant les virus peut ensuite être effectuée sur des supports tels que l'hydroxyapatite ou les gels chélatants (calcium...). Dans ce cas, le virus ne se fixe pas sur le support qui retient plus spécialement les acides nucléiques.

A la suite de cette étape, on procède à une gel filtration ou tamisage moléculaire (encore appelé perméation de gel) sur tout support approprié tel que le Sepharose 6FF™ (Pharmacia) ou le Fractogel™ (E. Merck). Lors de cette opération, l'élution permet de récupérer les particules virales dans la première fraction ; les pics d'élution suivants correspondent aux protéines virales et aux impuretés résiduelles. On conserve donc uniquement, pour la fabrication d'un vaccin, la première fraction de l'éluat.

De façon avantageuse, on peut procéder, entre la chromatographie d'adsorption et la gel filtration, à une étape de concentration, de préférence par ultra-

contenant des microsupports Cytodex 1™ à une concentration de 3 g/l. On ensemence le milieu par un inoculum de cellules Vero (200 000 cellules/ml).

On laisse les cellules se fixer et croître pendant quatre jours. A la fin des quatre jours, le milieu de culture est remplacé par un milieu de multiplication virale.

Un inoculum de virus est introduit dans la cuve avec une quantité de virus calculée pour avoir une multiplicité d'infection MOI égale à 1/500. Les différentes cultures sont effectuées à la température de 37°C. Trois jours après l'inoculation virale, on recueille le milieu de multiplication virale qui fournit la première récolte. Le milieu de multiplication virale est remplacé par un milieu neuf et une nouvelle récolte est effectuée tous les deux jours, le nombre total de récoltes étant égal à six.

Le tableau I montre les titres obtenus à chaque récolte.

Récoltes n°	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Jours après infection	3	5	7	10	12	14
Titre LD 50/ml	10 ^{8,4}	10 ^{8,4}	10 ^{8,5}	10 ^{8,1}	10 ^{8,2}	10 ^{7,3}

Les récoltes sont filtrées sur filtre membrane (diamètre des pores : 0,2 µm).

L'ensemble des récoltes est mélangé.

Le mélange de récolte est concentré d'un facteur 100 par ultrafiltration sur membrane 10 000 daltons.

Tableau II

Etape	DEAE	Chélation	Gel filtration
Protéines résiduelles (*)	50 %	100 %	0,4 %
Teneur en ADN (pg/ml)	< 7000	< 30	< 30
Virus récupéré (*) (ELISA protéine E)	90 %	76 %	20 %

(*) Rendements étapes par étape

La solution virale inactivée purifiée a été utilisée pour immuniser des souris par injection au jour 0 puis au jour 7. L'épreuve par le virus virulent est effectuée à l'aide d'une solution à 10^5 LD 50/ml au jour 30. Toutes les souris vaccinées par la préparation purifiée non diluée et par la préparation purifiée diluée au 1/32 ont été protégées. Dans le même test, les souris vaccinées par le vaccin Biken (dilution 1/32) ont été éprouvées et seules les 2/5 ont été protégées.

effectuée grâce aux opérations suivantes :

- . chromatographie par échange d'ions,
- . chromatographie d'adsorption,
- . perméation de gel.

5 7. Procédé selon une des revendications
précédentes, caractérisé en ce qu'il consiste en outre,
après l'étape de récolte d), à introduire à nouveau du
milieu de multiplication virale neuf, à attendre un temps
suffisant pour permettre à nouveau la multiplication du
10 virus, et à effectuer une nouvelle récolte du milieu de
multiplication virale.

8. Procédé selon la revendication 7, caracté-
risé en ce qu'il consiste à récolter le milieu de
multiplication virale et à le remplacer par du milieu
15 neuf, un nombre de fois compris entre 1 et 7.

9. Procédé selon une des revendications
précédentes, caractérisé en ce qu'il consiste en outre,
après l'étape d) à filtrer la suspension virale récoltée.

10. Procédé selon une des revendications
20 précédentes, caractérisé en ce que le milieu de multi-
plication virale possède une concentration en protéines
inférieure à 5 g/l.

11. Vaccin contre l'encéphalite japonaise,
caractérisé en ce qu'il comporte du virus de l'encépha-
lite japonaise obtenu par culture sur cellules provenant
25 d'une lignée cellulaire, et en ce que la teneur en ADN
cellulaire est inférieur à 100 pg/dose.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01195

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 171 765 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) 19 February 1986 cited in the application see the whole document ---	1-11
A	WO,A,91 09935 (IMMUNO A.G.) 11 July 1991 see page 1, paragraph 1 - paragraph 4; claims -----	1-11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. No Internationale No

PCT/FR 96/01195

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K39/12 C12N7/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 64, 1 Juillet 1977 Philadelphia, PA, US; abstract no. 2449, C.N. VENKATESHAN ET AL.: "COMPARATIVE STUDIES ON DIFFERENT METHODS FOR CONCENTRATION OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRAL ANTIGENS PREPARED FROM VERO CELL CULTURE." page 245; XP002000470 voir abrégé & INDIAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH, vol. 64, no. 11, 1976, pages 1557-1565;</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-11



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 Octobre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05. 11. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fonctionnaire autorisé

Duckebosch A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. te Internationale No

PCT/FR 96/01195

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-171765	19-02-86	JP-C- 1427486	25-02-88
		JP-A- 61047185	07-03-86
		JP-B- 62033879	23-07-87
		CA-A- 1251400	21-03-89
		US-A- 4725546	16-02-88

WO-A-9109935	11-07-91	AT-B- 393356	10-10-91
		AT-T- 113652	15-11-94
		CA-A,C 2071954	23-06-91
		DE-D- 59007659	08-12-94
		EP-A- 0506714	07-10-92
		ES-T- 2067916	01-04-95
		HR-A- 921354	29-02-96
		HU-A- 65410	28-06-94
JP-T- 5502581	13-05-93		
